

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-258098

(43) 公開日 平成7年(1995)10月9日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 31/705

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

ABR

ABS

ABU

ACF

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平6-53827

(22) 出願日

平成6年(1994)3月24日

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(71) 出願人 594050809

ソンゴウ クーシュエユエン チェンドウ

センウ イエンチュウソウ

中華人民共和国、スーツァンセン、チェン

ドウス、レンミンナンルー 4-9

(72) 発明者 徳田 昌彦

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会

社基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

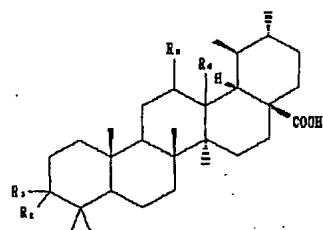
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドセリン受容体結合阻害剤

(57) 【要約】

【構成】 次の式 (I) :

【化1】

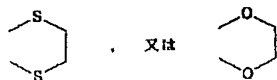


(1)

(式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は相互に独立に H 又は OH を表わし、但し  $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方は H であり、あるいは  $R_1$  と  $R_2$  は一緒になって次の式:

【化2】

$=O$  ,  $=NOH$  ,  $=N-NH_2$  ,



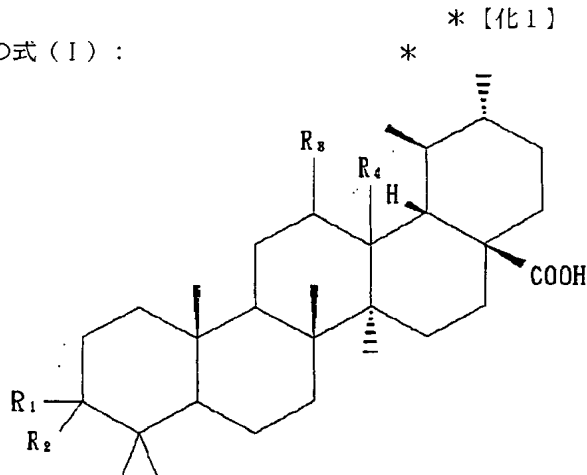
を表わし、 $R_3$  及び  $R_4$  は相互に独立に H 又はハロゲンを表わし、あるいは  $R_3$  と  $R_4$  は結合して、それらが結

合している炭素間に二重結合を形成する) で表わされるウルソン酸又はその塩を含んで成るエンドセリン受容体結合阻害剤。

【効果】 顕著なエンドセリン受容体結合阻害作用を有し、例えば高血圧治療、心・脳循環疾患治療、腎疾患治療に有用である。

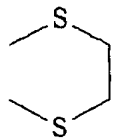
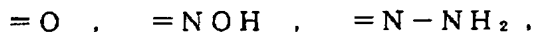
【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式(1)：

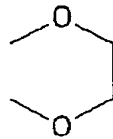


(式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は相互に独立にH又はOHを表わし、但し  $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方はHであり、あるいは、 $R_1$  と  $R_2$  は一緒になって、次の式：

【化2】



, 又は



を表わし、 $R_3$  及び  $R_4$  は相互に独立にH又はハロゲンを表わし、あるいは  $R_3$  と  $R_4$  は結合して、それらが結合している炭素原子間に二重結合を形成する)で表わされるウルソン酸類またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするエンドセリン受容体結合阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は高血圧治療、心・脳循環※

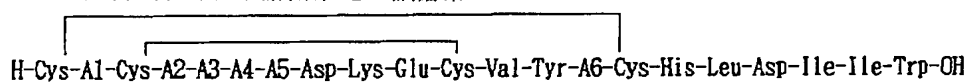
※疾患治療、腎疾患治療、喘息治療等に有用なエンドセリン受容体結合阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】エンドセリン(ET)は1988年柳沢らによりブタ動脈内皮細胞の培養上清から単離され構造決定された21個のアミノ酸からなる血管収縮性ペプチドである(柳沢ら、nature 332巻411~412項)。その後、エンドセリンをコードする遺伝子の研究からエンドセリンに構造の類似したペプチドの存在することが明らかにされ、それぞれエンドセリン1(ET1)、エンドセリン2(ET2)、及びエンドセリン3(ET3)と命名されている。これらエンドセリン類の構造は以下の通りである(ET1, 2, 3、における構成アミノ酸はすべてL体である)(井上らProc. Natl Acad. Sci. USA 86巻、2863~2867項)。

【0003】

【化3】



	A1	A2	A3	A4	A5	A6
ET1	Ser	Ser	Ser	Leu	Met	Phe
ET2	Ser	Ser	Ser	Trp	Leu	Phe
ET3	Thr	Phe	Thr	Tyr	Lys	Tyr

【0004】上記のエンドセリン類は生体内に存在し強力な血管収縮作用や昇圧作用を有していることから、循環系調節に関与する内因性因子であると予想され、高血圧症、心・脳循環疾患(例えば心筋梗塞)、腎疾患(例えば急性腎不全)および血管れん縮との関係が推定されている(J. Med. Chem., 35, 1493(1992))。また、気管支平滑筋収縮作用も有してお

り、喘息との関係も推定されている。

【0005】これまで、エンドセリン受容体結合阻害作用を有する種々のペプチドが報告されているが、非ペプチド性の化合物としてはアントラキノン誘導体(特開平3-47163号)やフェオフォルバイド誘導体(特開平5-331063号)が報告されているにすぎない。一方、ウルソン酸は1963年にウルソリン酸の酸化に

より合成されて以来 (Bull. Calcutta School Trop. Med., 11, 20 (1963))、様々な研究がなされているが、エンドセリン受容体結合阻害作用については報告されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のエンドセリン類の受容体結合を阻害する化合物が得られれば該エンドセリン類の作用機序の解明に役立つのみならず、上記の疾患の有効な治療薬になる可能性が大きいと考えられる。

本発明はエンドセリン受容体結合阻害作用を有する非ペプチド性の低分子として、ウルソ酸類を提供するもの\*

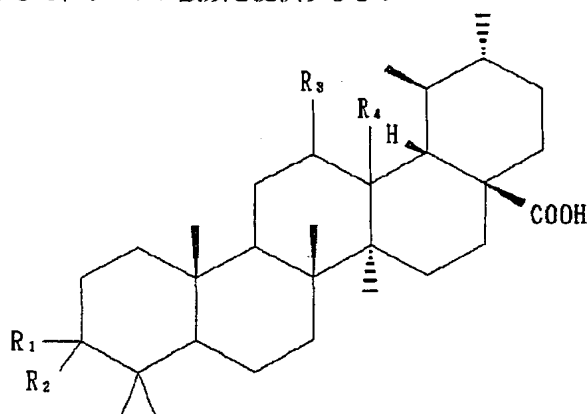
\*である。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情にかんがみ、エンドセリン類による強力な血管平滑筋収縮活性を抑制する作用を指標として中国薬用植物の抽出分離精製を進め、ウルソ酸が顕著なエンドセリン受容体結合阻害作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、次の式 (I) :

【0008】

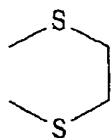
【化4】



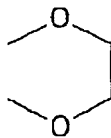
(I)

(式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は相互に独立に H 又は OH を表わし、但し  $R_1$  及び  $R_2$  の少なくとも一方は H であり、あるいは、 $R_1$  と  $R_2$  は一緒になって、次の式：

【化5】



, 又は

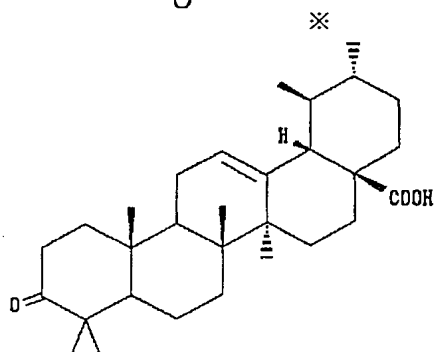


30

※で表わされるウルソ酸類またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするエンドセリン受容体結合阻害剤を提供するものである。一般式 (I) に示される化合物の1種であるウルソ酸 (I') :

【0009】

【化6】



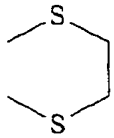
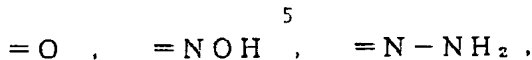
(I')

はトリテルペン化合物であり、中国薬用植物から公知の方法で分離精製して得ることができる。また公知の方法 (Khim. Farm. Zh., 20, 568 (1966) etc.) に依って、ウルソ酸 ( $R_1$  : OH,  $R_2$  : H, Aldrich 30, 172-8) を酸化することによって製造することができる。また、 $R_1$  と

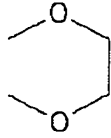
$R_2$  が一緒になって、次の式：

【0010】

【化7】



, 又は



を表わす化合物は、 $R_1$  と  $R_2$  で  $=O$  を表わす化合物にそれぞれ、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、エチレングリコール又はエタンジチオールを反応させることによ

って製造することができる。また、 $R_3$  及び/又は  $R_4$  がハロゲンを表わす化合物は、 $R_3$  と  $R_4$  が結合して二重結合を形成する化合物にハロゲンまたはハロゲン化水素を反応させることにより製造することができ、 $R_3$  と  $R_4$  がともに  $H$  を表わす化合物は、水素添加することにより製造することができる。

【0011】本発明においてウルソン酸類の薬理学的に許容される塩とは、無機塩基との塩、有機塩基との塩、アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基としては、アルカリ金属類、例えばリチウム、ナトリウム、カリウムなどおよびアルカリ土類、例えばマグネシウム、カルシウムなどである。しかし他の金属、例えばアルミニウム、亜鉛、鉄なども本発明に含まれる。有機塩基としては、アミン類、例えば、アンモニア、1級アミン、2級アミン、3級アミン、含窒素ヘテロ環（脂肪族、芳香族を含む）が挙げられる。

【0012】より具体的には、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、プロピルアミン、ジプロピルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、ブチルアミン、ジブチルアミン、イソブチルアミン、 $t$ -ブチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ピロリジン、ペペリジン、モルホリン、ピロール、ピリジン、などが挙げられる。アミノ酸としては、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどが挙げられる。

【0013】本発明はウルソン酸類およびそれらの塩を有効成分として含有するエンドセリン受容体結合阻害剤に関し、エンドセリン受容体結合阻害剤は具体的には哺乳動物（例、ヒト、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなど）において、エンドセリンによって引き起こされる種々の疾病、例えば高血圧症、狭心症、心筋症、動脈硬化症、心筋梗塞、レイノー症、大脳動脈れん縮、大脳虚血、クモ膜下出血後の大動脈れん縮、喘息、急性腎不全などの治療および予防に、血管拡張剤として使用することができる。

【0014】本発明のエンドセリン受容体結合阻害剤は、経口的または非経口的に投与することができる。投与剤形としては、錠剤、ペレット剤、カプセル剤、顆粒剤、乳化剤、懸濁剤、注射剤などが挙げられる。これら

の投与剤形は、それぞれ適宜の担体、賦形剤、その他必要に応じて添加剤を用いて、定法に従って製造される。

【0015】式(1)で表わされるウルソン酸類の1日の投与量は、患者の状態や体重、該誘導体の種類、投与経路などによって、異なるが、例えば、非経口的には、皮下、静脈内、筋肉内または直腸内に約0.01~20 mg/kg/日、好ましくは約0.1~10 mg/kg/日投与する。経口剤としては、約0.1~100 mg/kg/日、好ましくは約1~10 mg/kg/日投与することが望ましい。既に報告されている、エンドセリン受容体結合阻害作用を有する種々のペプチドに比して、非ペプチド性低分子化合物である、本発明になるウルソン酸類は、経口的に分解せずに投与できることさらに天然物から容易に入手出来るなどの利点を有する。

【0016】

【実施例】以下に実施例を上げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例で用いた薄相クロマトグラフィーのプレートとしてはメルク社製品（Silica Gel 60 F 254）を用いた。

【0017】実施例. ウルソン酸の単離

中国四川省で採集された、丁座草 [*Xylanche himalaica* (Hook. f. et Thoms) G. Beck (Orobanchaceae)] の全草を乾燥、粉碎し、室温で95%エタノールにより抽出し、得られた抽出液を60度以下で減圧濃縮した。この抽出物30グラムを酢酸エチル可溶成分と不溶成分に分離し、可溶成分(7.93g)をシリカゲル1キログラムのシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにより、ヘキサン-イソプロパノール96対4の溶出液で分離した。活性画分収量は3.44gであり、 $R_f = 0.42$  (ヘキサン-イソプロパノール=10:1)であった。

【0018】この画分をさらにシリカゲル180グラム、溶出液ヘキサン-イソプロパノール97対3から90対10のステップグラジエントのクロマトグラフィーにより分離した。活性画分収量は3.19gであり、 $R_f = 0.38$  (ヘキサン-イソプロパノール=90:10)であった。さらにこの画分をヘキサン-酢酸エチル80対20から0対100の溶出液、150グラムのシリカゲルを用いたクロマトグラフィーにより分離した。活性画分収量は257mgであり、 $R_f = 0.49$  (ヘキサン-酢酸エチル=75:25)であった。

【0019】この画分をジクロロメタン-メタノール99対1の溶出液で25グラムのシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにより分離した。活性画分収量は101mgであり、 $R_f = 0.69$  (ジクロロメタン-メタノール=95:5)であった。最終的にHPLC (Shimadzu LC-6A system, Merck Hibar RT250-25 LiChroso

rb Si 60 7  $\mu$ m, 254 nm, 9.9 ml/min, 20°C、ヘキサン-イソプロパノール=95:5)により活性画分を精製してエンドセリン受容体結合阻害物質としてウルソン酸を単離した。収量は16.7mgであり、Rf=0.69 (ジクロロメタン-メタノール=95:5)であった。

【0020】次に、本発明のウルソン酸の薬理作用について述べる。

#### 受容体結合試験

##### (1) エンドセリンレセプター標品

ラット胎児胸部大動脈由来株化細胞A10 (Bmax: 20.3 PM, ATCC CRL 1476) をレセプター細胞膜標品とする測定キット (デュボン社製、米国) を用いた。測定マニュアルに従って、A10細胞懸濁液5mlに希釈液 (CaCl<sub>2</sub>, BSA, Bacitracin 含有50mMトリス緩衝液、pH7.4) 38mlを加え、レセプター希釈標品とした。

【0021】(2) <sup>125</sup>I-エンドセリン結合実験  
ラジオ・リガンドとして <sup>125</sup>I-エンドセリン-1 (8\*

\* 1.4 TBq/mmol、デュボン社製、米国) を8.5 KBq 添加し、レセプター希釈標品175  $\mu$ lおよびサンプル25  $\mu$ lを添加した。非特異的結合量は、 $1 \times 10^{-6}$  Mのエンドセリン-1を添加して測定した。反応は250  $\mu$ lのトリス緩衝液中で、室温、2時間行った。

【0022】反応後、セルハーベスター (M-30、ブランドル社製、米国) を用いて、グラスフィルター上で (GF/B、ホワットマン社製、米国) 急速ろ過し、50mMトリス緩衝液 (pH7.4) で3回洗浄し、フィルター上に残存する放射活性をガンマ・カウンターで測定した。その結果、エンドセリン-1の受容体への結合を50%阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) は約5  $\mu$ g/mlであった。

##### 【0023】

【発明の効果】本発明によって、ウルソン酸類 (I) またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するエンドセリン受容体結合阻害剤を提供することができる。該受容体結合阻害剤は、高血圧症、狭心症、心筋症、動脈硬化症、心筋梗塞、血管れん縮、喘息、急性腎不全などの治療および予防剤として有用である。

#### フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/705	ACV AED			
C 07 J 63/00		9051-4C		
// C 07 C 62/24		9450-4H		
251/44				
251/84				
(72)発明者 ディン リーシェン	(72)発明者 川辺 紀雄			
中華人民共和国、スーツァンセン、チェン	神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会			
ドウス、レンミンナンルー 4-9	社基礎研究所内			
	(72)発明者 戸上 泰彦			
	神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会			
	社基礎研究所内			